

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ



دانشگاه علوم پزشکی و
خدمات بهداشتی درمانی استان اردبیل

وزارت بهداشت درمان و آموزش پزشکی

دانشگاه علوم پزشکی اردبیل

دانشکده پزشکی

پایان نامه جهت اخذ درجه کارشناسی ارشد بیوشیمی بالینی

عنوان:

تاثیر آندروگرافولید روی بیان ژن هپسیدین در موش
صحرائی نر نژاد ویستار دچار اضافه باری ثانویه آهن

اساتید راهنما:

دکتر رضا علی پناه مقدم

دکتر علی نعمتی

استاد مشاور:

ودود ملک زاده

نگارش:

فریده منافی

مهرماه 1395

شماره پایان نامه: 023

مفتخرم که ماحصل دانشم را با نهایت افتخار و امتنان تقدیم می کنم به:

پدر بزرگوار و مادر مهربان

و

خواهر عزیزم سعیده

تشکر و قدردانی

نخستین سپاس و ستایش از آن خداوندی است که بنده کوچکش را در دریای بیکران اندیشه، قطره ای ساخت تا وسعت آن را از دریچه اندیشه های ناب آموزگارانی بزرگ به تماشا نشیند. لذا اکنون که در سایه سار بنده نوازی هایش پایان نامه حاضر به انجام رسیده است. بر خود لازم می دانم تا مراتب سپاس را از بزرگوارانی بجا آورم که اگر دست یاریگرشان نبود، هرگز این پایان نامه به نتیجه نمی رسید. ابتدا از استاد گرانقدرم آقای دکتر رضا علی پناه مقدم که زحمت راهنمایی این پایان نامه را برعهده داشتند، کمال سپاس را دارم. از اساتید عالی قدردم جناب آقای دکتر علی نعمتی و جناب آقای ودود ملک زاده که زحمت مشاوره این پایان نامه را متحمل شدند، صمیمانه تشکر میکنم. همچنین از دوستان عزیزم سرکار خانم لیلا حسین زاده، مرضیه شریفی، سمیرا محمودی نیا، یاور محمود زاده، آرش مهری به خاطر کمک هایی که نارم داشتند ممنون و متشکرم. سپاس آخر تقدیم به دو همراه مهربان زندگیم، پدر و مادر عزیزم که همیشه دعاهایشان بدرقه راهم بوده است و خواهران و برادرم که پیوسته مشوق من در این راه بوده اند.

[Type the document title]

چکیده

زمینه و هدف: تزریق مکرر و منظم خون در بیماران هماتولوژیک و انکولوژیک به اضافه بار ثانویه ی آهن و فرایند التهاب منجر می شود. آندروگرافولید گیاهی حاوی ترکیبات فلاونوئیدی است که دارای اثرات آنتی اکسیداتی و ضد التهابی می باشد. در این تحقیق اثر آندروگرافولید بر میزان بیان ژن هپسیدین در موشهای صحرایی دچار اضافه بار ثانویه ی آهن ناشی از آهن سوکروز مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش: 48 موش آزمایشگاهی نر نژاد ویستار، در شش گروه هشت تایی قرار گرفتند. داروی آهن سوکروز با دوز 75 میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن حیوان به صورت داخل صفاقی به مدت 12 روز تزریق شد. بعد از ایجاد مدل اضافه بار ثانویه آهن، حیوانات با عصاره آندرو گرافولید، با دو دوز 3/5 و 7 میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن به مدت 6 روز تیمار شدند. در پایان آزمایش نمونه های خونی جهت اندازه گیری غلظت سرمی آهن و پروتئین سرمی هپسیدین جمع آوری و در نهایت نمونه های بافت کبد جهت استخراج RNA جدا و نگهداری شدند.

یافته ها: با توجه به بررسی میزان بیان ژن هپسیدین و پروتئین سرمی آن به نظر می رسد دوز موثر آندروگرافولید برای کاهش بیان ژن هپسیدین در موشهای صحرایی دچار اضافه بار ثانویه ی آهن ، هر دو دوز 3/5 و 7/5 میلی گرم برکیلو گرم می باشد.

نتیجه گیری: عصاره ی آندروگرافولید باعث کاهش بیان ژن هپسیدین در موشهای صحرایی دچار اضافه بار ثانویه آهن داشت.

واژگان کلیدی: اضافه بار ثانویه آهن، هپسیدین، عصاره ی آندروگرافولید

فهرست مطالب

صفحه

عنوان

فصل اول طرح تحقیق..... Error! Bookmark not defined.

1-1- مقدمه و بیان مسأله..... Error! Bookmark not defined.

1-2- تعریف واژه..... Error! Bookmark not defined.

1-3- اهداف و فرضیات..... Error! Bookmark not defined.

1-3-1- اهداف کلی..... Error! Bookmark not defined.

1-3-2- اهداف اختصاصی..... Error! Bookmark not defined.

1-3-3- اهداف کاربردی..... Error! Bookmark not defined.

1-4- فرضیات..... Error! Bookmark not defined.

فصل دوم پیشینه ی تحقیق..... Error! Bookmark not defined.

2-1- کبد..... Error! Bookmark not defined.

2-1-1- هیستولوژی کبد..... Error! Bookmark not defined.

2-1-2- عملکرد کبد..... Error! Bookmark not defined.

2-2- آهن..... Error! Bookmark not defined.

2-2-1- منابع آهن در بدن..... Error! Bookmark not defined.

2-2-2- نقش آهن در ایجاد آسیب کبدی..... Error! Bookmark not defined.

2-2-3- ذخیره آهن..... Error! Bookmark not defined.

2-2-4- تعادل تغذیه ای آهن..... Error! Bookmark not defined.

2-2-5- پروتئین های انتقال دهنده آهن..... Error! Bookmark not defined.

2-2-5-1- DMT-1 (Divalent metal-iron transporter)..... Error! Bookmark not defined.

2-2-5-2- فروپورتین (Fpn)..... Error! Bookmark not defined.

2-2-5-3- ترانسفرین (Transferrin)..... Error! Bookmark not defined.

2-2-5-4- سرولوپلاسمین..... Error! Bookmark not defined.

2-2-5-5- هفاستین :..... Error! Bookmark not defined.

2-2-6- متابولیسم آهن..... Error! Bookmark not defined.

2-3- هپسیدین.....	Error! Bookmark not defined.
2-3-1- ساختار و ایزوform های هپسیدین.....	Error! Bookmark not defined.
2-3-2- هپسیدین و تاثیر آن روی هموستاز آهن.....	Error! Bookmark not defined.
2-3-3- عوامل موثر در تولید هپسیدین توسط کبد.....	Error! Bookmark not defined.
2-3-3-1- مسیر تنظیمی وابسته به فعالیت خون سازی.....	Error! Bookmark not defined.
2-3-3-2- مسیر تنظیمی وابسته به ذخایر آهن.....	Error! Bookmark not defined.
2-3-3-3- مسیر تنظیمی وابسته به التهاب.....	Error! Bookmark not defined.
2-3-3-4- مسیر تنظیمی وابسته به هیپوکسی.....	Error! Bookmark not defined.
2-4- پاتوفیزیولوژی هموکروماتوز.....	Error! Bookmark not defined.
2-4-1- انواع هموکروماتوز :.....	Error! Bookmark not defined.
2-4-2- هموکروماتوز ارثی تیپ I: HH-I.....	Error! Bookmark not defined.
2-4-3- هموکروماتوز ارثی تیپ II: HH-II.....	Error! Bookmark not defined.
2-4-4- هموکروماتوزیس ارثی تیپ III: HH-III.....	Error! Bookmark not defined.
2-4-5- هموکروماتوزیس ارثی تیپ IV: HH-LV.....	Error! Bookmark not defined.
2-4-6- هموکروماتوز ثانویه.....	Error! Bookmark not defined.
2-5- مشخصات سیستماتیک آندروگرافولید.....	Error! Bookmark not defined.
2-5-1- محل رویش آندروگرافولید.....	Error! Bookmark not defined.
2-5-2- آندروگرافیس پانیکولاتا.....	Error! Bookmark not defined.
2-5-3- استفاده در سیستم پزشکی سنتی.....	Error! Bookmark not defined.
2-5-4- خواص آنتی اکسیدانی آندروگرافیس پانیکولاتا.....	Error! Bookmark not defined.
2-6- بررسی متون.....	Error! Bookmark not defined.
فصل سوم مواد و روشها.....	Error! Bookmark not defined.
3-1- مواد، ترکیبات شیمیایی و کیت های آنزیمی مورد استفاده در تحقیق.....	Error! Bookmark not defined.
3-2- نام ظروف و وسایل مورد استفاده.....	Error! Bookmark not defined.
3-3- تجهیزات الکتریکی مورد استفاده.....	Error! Bookmark not defined.
3-4- حیوان آزمایشگاهی مورد مطالعه.....	Error! Bookmark not defined.

3-5	دلایل انتخاب این حیوان به طور خلاصه عبارتند از
3-6	شرایط نگه داری حیوانات
3-7	نحوه ی ایجاد مدل اضافه بار ثانویه ی آهن
3-8	نحوه ی گروه بندی
3-9	آماده کردن حیوانات برای خونگیری
3-10	جدا سازی کبد و خونگیری از قلب موش صحرایی
3-11	جداسازی سرم از خون موشها
3-12	اندازه گیری آهن
3-13	اندازه گیری گلوکز
3-14	استخراج RNA
3-13-1	اندازه گیری مقدار RNA استخراج شده
3-13-2	بررسی کیفی RNA استخراج شده
3-13-3	تیمار RNA استخراج شده
3-13-4	ستنز cDNA از RNA استخراج شده
3-14	نحوه ی انجام واکنش RT-PCR با ژن GAPDH
3-14-1	الکتروفورز محصول PCR بر روی ژل آگارز
3-14-2	تهیه ژل آگارز 1/2٪
3-14-3	نحوه ی انجام الکتروفورز
3-14-4	آشکار سازی ژل
3-15	آماده سازی پرایمرها
3-16	روش SYBR green qRT-PCR
3-17	تجزیه و تحلیل داده های SYBR green qRT-PCR
3-18	بررسی پاتولوژی برای اثبات مدل اضافه بار آهن
3-19	الایزا
3-20	آنالیز آماری
	فصل چهارم نتایج
4-1	نتایج بررسی های هیستوپاتولوژی

- 4-2- ارزیابی کیفی سه باند RNA استخراج شده..... **Error! Bookmark not defined.**
- 4-3- کنترل واکنش سنتز cDNA توسط RT-PCR..... **Error! Bookmark not defined.**
- 4-4- نتایج بررسی های مولکولی..... **Error! Bookmark not defined.**
- 4-4-1- بررسی اختصاصی بودن و پرایمردایمر ژن خانگی GAPDH و ژن Hepcidin .. **Error! Bookmark not defined.**
- 4-4-2- نتایج حاصل از Real Time PCR برای ژن GAPDH..... **Error! Bookmark not defined.**
- 4-4-3- بررسی محصول Real time PCR بر روی ژل آگارز..... **Error! Bookmark not defined.**
- 4-4-4- نتایج حاصل از Real Time PCR برای ژن Hepcidin..... **Error! Bookmark not defined.**
- 4-4-5- بررسی محصول Real time PCR بر روی ژل آگارز..... **Error! Bookmark not defined.**
- 4-4-6- بررسی کمی بیان ژن هپسیدین به روش Real time PCR..... **Error! Bookmark not defined.**
- 4-4-7- جدول مقایسه بیان کمی ژن هپسیدین نسبت به گروه کنترل .. **Error! Bookmark not defined.**
- 4-5- نتایج بررسی های بیوشیمیایی..... **Error! Bookmark not defined.**
- 4-5-1- تاثیر آندروگرافولید روی سطح آهن سرم..... **Error! Bookmark not defined.**
- 4-5-2- بررسی تاثیر آندروگرافولید روی میزان گلوکز خون ناشتایی . **Error! Bookmark not defined.**
- 4-5-3- بررسی تاثیر آندروگرافولید روی میزان هپسیدین سرم..... **Error! Bookmark not defined.**
- فصل پنجم بحث و نتیجه گیری..... **Error! Bookmark not defined.**
- 5-1- بحث..... **Error! Bookmark not defined.**
- 5-1-1- آندروگرافولید باعث افزایش سطح آهن سرم در موش صحرایی دچار اضافه باری ثانویه آهن می شود..... **Error! Bookmark not defined.**
- 5-1-2- آندروگرافولید باعث کاهش سطح گلوکز در موش صحرایی دچار اضافه باری ثانویه آهن می شود..... **Error! Bookmark not defined.**
- 5-2- نتیجه گیری:..... **Error! Bookmark not defined.**
- 5-3- پیشنهادات:..... **Error! Bookmark not defined.**
- 5-4- منابع:..... **Error! Bookmark not defined.**

فهرست اشکال

عنوان	صفحه
شکل 1-1 مربوط به واکنش فنتون.....	Error! Bookmark not defined.
شکل 1-2 مربوط به جذب، انتقال و متابولیسم آهن.....	Error! Bookmark not defined.
شکل 1-4 اثبات رسوب آهن در کبد با رنگ آمیزی اختصاصی آهن (پروسین بلو)،	Error! Bookmark not defined.
شکل 2-4 بارگذاری محصول PCR مربوط به ژن GAPDH روی ژل آگارز 1/2 درصد	Error! Bookmark not defined.
شکل 3-4 منحنی ذوب مربوط به ژن GAPDH به عنوان ژن خانگی، در گروه های مورد مطالعه	Error! Bookmark not defined.
شکل 4-4 تصاویر مربوط به رسم منحنی تکثیر برای ژن GAPDH به عنوان ژن خانگی، در گروه های مورد مطالعه	Error! Bookmark not defined.
شکل 5-4 بارگذاری محصول Real time pcr مربوط به ژن GAPDH	Error! Bookmark not defined.
شکل 6-4 منحنی ذوب مربوط به ژن hepcidine در گروه های مورد مطالعه ..	Error! Bookmark not defined.
شکل 7-4 تصاویر مربوط به رسم منحنی تکثیر برای ژن hepcidine در گروه های مورد مطالعه .	Error! Bookmark not defined.
شکل 8-4 بارگذاری محصول Real time pcr مربوط به ژن Hepcidin	Error! Bookmark not defined.

فهرست نمودارها

صفحه	عنوان
Error! Bookmark not defined.	نمودار 1-4- مقایسه میزان بیان ژن هپسیدین در گروه های مورد مطالعه.
Error! Bookmark not defined.	نمودار 2-4- میانگین غلظت سرمی آهن در گروه های مورد مطالعه.
Error! Bookmark not defined.	نمودار 3-4: مقایسه گلوکز خون ناشتایی در گروه های مورد مطالعه.
Error! Bookmark not defined.	نمودار 4-4: مقایسه میزان هپسیدین سرم در گروه های مورد مطالعه.

فهرست جداول

عنوان	صفحه
جدول 3-1- آماده سازی نمونه ها جهت تیمار با آنزیم DNaseI	Error! Bookmark not defined.
جدول 3-2 - مرحله اول سنتز cDNA	Error! Bookmark not defined.
جدول 3-3 - مرحله دوم سنتز cDNA	Error! Bookmark not defined.
جدول 3-4 - واکنش RT-PCR برای GAPDH	Error! Bookmark not defined.
جدول 3-5- مراحل دمایی واکنش pcr برای پرایمر GAPDH	Error! Bookmark not defined.
جدول 3-6- تهیه Master mix	Error! Bookmark not defined.
جدول 3-7 - توالی ژن های مورد استفاده در این مطالعه و دمای اتصال آنها.	Error! Bookmark not defined.
جدول 3-8- پروتکل دمایی سه مرحله ای کیت Real time برای ژن های GAPDH و Hepcidin	Error! Bookmark not defined.

اختصارات

DMT-1	Divalent metal-iron transporter
NTC	No template control
HAMP	Hepcidin antimicrobial peptide
IL-6	Interleukin-6
Tf-Fe⁺³	Transferrin-Feric complex